

PCT/JP97/04898

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

23.01.98

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application:

1 9 9 6 年 1 2 月 2 7 日

REC'D 20 MAR 1998

出 願 番 号
Application Number:

平成 8 年特許願第 3 4 9 5 4 1 号

WIPO

PCT

出 願 人
Applicant (s):

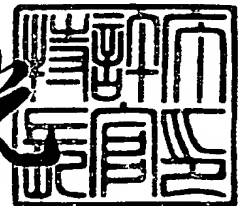
サントリー株式会社

PRIORITY DOCUMENT

1 9 9 8 年 3 月 6 日

特 許 庁 長 官
Commissioner,
Patent Office

荒井寿光



出証番号 出証特平 10-3012618

【書類名】 特許願

【整理番号】 964641

【提出日】 平成 8年12月27日

【あて先】 特許庁長官 荒井 寿光 殿

【国際特許分類】 C12P 7/40

【発明の名称】 微生物培養用培地、並びに不飽和脂肪酸またはこれを含む脂質の製造方法

【請求項の数】 24

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-602

【氏名】 東山 堅一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府茨木市西中条町 4-5-307

【氏名】 矢口 敏昭

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町山崎 1-9-5-1006

【氏名】 秋元 健吾

【発明者】

【住所又は居所】 京都府京都市右京区常盤山下町 6-9

【氏名】 清水 昌

【特許出願人】

【識別番号】 000001904

【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代表者】 鳥井 信一郎

【代理人】

【識別番号】 100077517

【弁理士】

【氏名又は名称】 石田 敬

【電話番号】 03-5470-1900

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871

【弁理士】

【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269

【弁理士】

【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898

【弁理士】

【氏名又は名称】 西山 雅也

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 036135

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9300154

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 微生物培養用培地、並びに不飽和脂肪酸またはこれを含む脂質の製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地。

【請求項2】 リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ10～45 mM、10～45 mM、5～40 mM、1～6 mM、1～9 mMの範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地。

【請求項3】 上記微生物が、糸状菌であることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物培養用培地。

【請求項4】 上記微生物が、モルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物であることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物培養用培地。

【請求項5】 上記微生物が、モルティエセラ属モルティエセラ亜属 (subgenus Mortierella) に属する微生物であることを特徴とする請求項1又は2記載の微生物培養用培地。

【請求項6】 5～60 mMのリン酸イオン、5～60 mMのカリウムイオン、2～50 mMのナトリウムイオン、0.5～9 mMのマグネシウムイオンおよび0.5～12 mMのカルシウムイオンの微生物培養用培地への使用。

【請求項7】 10～45 mMのリン酸イオン、10～45 mMのカリウムイオン、5～40 mMのナトリウムイオン、1～6 mMのマグネシウムイオンおよび1～9 mMのカルシウムイオンの微生物培養用培地への使用。

【請求項8】 不飽和脂肪酸またはこれを含む脂質の製造方法であって、モルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物を、リン酸イオンが5～60 mM、カリウムイオンが5～60 mM、ナトリウムイオンが2～50 mM、マグネシウムイオンが0.5～9 mMおよびカルシウムイオンが0.5～12 mM

の範囲にある培地中で、培養することを特徴とする不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法。

【請求項9】 不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法であって、モルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物を、リン酸イオンが10～45 mM、カリウムイオンが10～45 mM、ナトリウムイオンが5～40 mM、マグネシウムイオンが1～6 mMおよびカルシウムイオンが1～9 mMの範囲にある培地中で、培養することを特徴とする不飽和脂肪酸またはこれを含有する脂質の製造方法。

【請求項10】 前記リン酸イオンが、リン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム、リン酸一水素二ナトリウム及びリン酸二水素一ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも1つ以上の塩類によって供給されることを特徴とする請求項8又は9記載の製造方法。

【請求項11】 前記カリウムイオンが、リン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム及び塩化カリウムからなる群より選ばれた少なくとも1つ以上の塩類によって供給されることを特徴とする請求項8乃至10のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項12】 前記ナトリウムイオンが、リン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素一ナトリウム、塩化ナトリウム及び硫酸ナトリウムからなる群より選ばれた少なくとも1つ以上の塩類によって供給されることを特徴とする請求項8乃至11のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項13】 前記マグネシウムイオンが、塩化マグネシウム及び／又は硫酸マグネシウムの塩類によって供給されることを特徴とする請求項8乃至12のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項14】 前記カルシウムイオンが、塩化カルシウム及び／又は炭酸カルシウムの塩類によって供給されることを特徴とする請求項8乃至13のいずれか1項記載の製造方法。

【請求項15】 前記イオンが、リン酸二水素一カリウム (KH_2PO_4)、無水硫酸ナトリウム (Na_2SO_4)、塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 及び塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) の組合せによって供給されることを特徴とする

請求項 8 又は 9 記載の製造方法。

【請求項 16】 前記不飽和脂肪酸がアラキドン酸、 γ -リノレン酸、ジホモ- γ -リノレン酸、ミード酸及び／又はエイコサペンタエン酸であることを特徴とする請求項 8 乃至 15 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 17】 前記モルティエセラ (Mortierella) 属に属する微生物が、モルティエセラ亜属 (subgenus Mortierella) に属する微生物である請求項 8 乃至 16 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 18】 前記モルティエセラ亜属 (subgenus Mortierella) に属する微生物が、モルティエセラ・アルピナ (Mortierella alpina)、モルティエセラ・エロンガタ (Mortierella elongata)、モルティエセラ・エキシグア (Mortierella exigua) 又はモルティエセラ・ヒグロフィラ (Mortierella hygrophila) である請求項 17 記載の製造方法。

【請求項 19】 さらに前記培地に大豆から得られる窒素源を添加することを特徴とする請求項 8 乃至 18 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【請求項 20】 前記大豆から得られる窒素源が、水分を除く成分当りの窒素含量が少なくとも 2 重量%以上であることを特徴とする請求項 19 記載の製造方法。

【請求項 21】 前記大豆から得られる窒素源が、脱脂大豆、未脱脂大豆、及びこれらに加工を施したもののからなる群より選ばれた少なくとも一つ以上であることを特徴とする請求項 19 又は 20 記載の製造方法。

【請求項 22】 前記脱脂大豆又は未脱脂大豆に施される加工が、熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；又は該処理を含む化学的及び／又は物理的処理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；及び／又は篩い分けであることを特徴とする請求項 21 記載の製造方法。

【請求項 23】 前記大豆から得られる窒素源が、脱脂大豆に少なくとも熱変性を施したものであることを特徴とする請求項 19 又は 20 記載の製造方法。

【請求項 24】 さらに前記培地に酵母エキスを添加することを特徴とする請求項 8 乃至 23 のいずれか 1 項記載の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、新規な微生物培養用培地、並びに該培地中で不飽和脂肪酸生産能を有するモルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物を培養して得られる不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

アラキドン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、エイコサペンタエン酸、ミード酸等の不飽和脂肪酸は強力かつ多彩な生理活性を有するプロスタグランジン、トロンボキサン、プロスタサイクリン、ロイコトリエン等の前駆物質といわれ、近年注目されている。例えばアラキドン酸は、特に乳児の発育に必要な成分として、DHA (ドコサヘキサエン酸) とともに急速に研究が進められており、Lanti ngらは生後3週間以上母乳で育てた乳児と育児用粉乳で育てた乳児を9歳まで追跡調査し、行動面などから脳神経の小さな障害の発生率を検討した結果、育児用粉乳で育った子供の脳障害発生率は母乳で育った子供の2倍であると報告 (LANCET, vol. 344, 1319-1322 (1994)) した。

【0003】

このショッキングな結果は母乳には存在するが育児用粉乳にはほとんど存在しないDHAやアラキドン酸などの不飽和脂肪酸が脳の発達に関与したためだろうと推測されている。この他にも、不飽和脂肪酸が新生児の脳および網膜の発達に関与しているだろうとする結果が相ついで報告されるようになり、未熟児および新生児栄養の領域においてホットな話題として注目されている。

【0004】

これら、不飽和脂肪酸は動物界に広く分布しており、例えば、アラキドン酸は動物の副腎腺や肝臓から抽出した脂質から分離されている。しかしながら不飽和脂肪酸の含量は少なく、大量供給方法としては不十分であったことから、種々の微生物を培養して不飽和脂肪酸を得る方法が考案されてきた。中でもモルティエレラ属に属する微生物は、アラキドン酸、ジホモ-γ-リノレン酸、エイコサペ

ンタエン酸等の不飽和脂肪酸を生産する微生物として知られており、この微生物を用いた発酵法による該脂肪酸を製造する方法が開発されている（特開昭63-44891、特開昭63-12290、特開昭63-14696、特開昭63-14697）。

【0005】

さらにモルティエレラ属微生物に変異処理を施して得られる、 $\Delta 12$ 不飽和化活性が低下又は欠失している変異株を用いてミード酸を製造する方法も知られている（特開平5-91888）。また、モルティエレラ属微生物に変異処理を施して得られる、 $\Delta 5$ 不飽和化活性が低下又は欠失している変異株を用いて、ジホモ- γ -リノレン酸を著量製造する方法も知られている（特開平5-91887）。

【0006】

しかし、モルティエレラ属のような糸状菌を用いて液体培地で発酵生産を行なう場合、往々にして菌体増殖による培養液粘度の増加とそれに伴う酸素供給不足が起こり、その対策として開発された溶存酸素濃度制御法（特開平6-153970）は生産性向上に大きく貢献しているものの、工業規模での培養で経済的に優れた高生産を実現するのにこれで十分とはいえず、より安価な培地や微量栄養素の探索、培養液流動性改善のための菌形態の制御法等の幅広い培養技術開発が不可欠である。

【0007】

このような技術開発の方策として、微量栄養素として塩類の添加が不飽和脂肪酸生産性や菌形態に及ぼす影響が検討されており、中でもカリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸の各イオンについては、添加効果に関して種々の報告が成されている（国際出願 WO96/21037、特開平8-214893、Appl.Microbiol.Biotechnol.,vol.39,p.450(1993)、Biotechnology Lett.,vol.12,no.6,p.455(1990)、油化学,vol.37,no.3,p.241(1989)、油化学,vol.42,no.11,p.893(1993)）。しかし、一方でこれら主なイオンを全て栄養補給という概念を上回る0.5mM以上の濃度で添加して、より積極的な不飽和脂肪酸生産性向上効果を求めた検討を行ない、なおかつ添加イオンバランスが及ぼ

す菌形態や脂質組成への影響までも検討した報告は成されておらず、イオン添加法の最適化が望まれるところである。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

従って本発明は、モルティエレラ属に属する微生物の発酵法による不飽和脂肪酸含有油脂の製造方法であって、培地に塩類を添加することによって、不飽和脂肪酸生産性、具体的には菌の増殖、不飽和脂肪酸の蓄積、総脂質の蓄積の全てを向上をさせ経済的かつ安定的に不飽和脂肪酸含有油脂を提供しようとするものである。また本発明は例えば不飽和脂肪酸が高収率で得られるなどの利点を有し、かつ安価な微生物培養用培地を提供しようとするものである。

【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者等は、上記課題を解決するために培地への塩類添加効果について、不飽和脂肪酸収率のみならず、菌形態、脂質組成変化に関して総合的に検討した結果、カリウム、ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸の全イオンを所定の濃度でかつバランス良く添加することが極めて有効であることを見出し本発明を完成した。

【0010】

従って本発明は、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地を提供する。

本発明において、不飽和脂肪酸とは炭素数が16以上でかつ二重結合が1個以上の脂肪酸をいい、またこの中で炭素数が18以上でかつ二重結合が2個以上の脂肪酸を一般に高度不飽和脂肪酸といい、例えば γ -リノレン酸、ジホモ γ -リノレン酸、アラキドン酸、エイコサペンタエン酸、ミード酸、6、9-オクタデカジエン酸、8、11-エイコサジエン酸等を挙げる事ができる。

【0011】

【具体的な説明】

本発明の微生物培養用培地は、培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲、好ましくはそれぞれ10～45 mM、10～45 mM、5～40 mM、1～6 mM、1～9 mMの範囲にあり、微生物、例えば、糸状菌を培養する際に用いることができる。

【0012】

本発明の培地を用いることによって、不飽和脂肪酸生産能を有するモルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物の場合、その培養物から不飽和脂肪酸を高収率で得ることが可能となる。なお本発明の培地は、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオン以外の成分（例えば炭素源、窒素源、微量栄養源等）を、使用する微生物に応じて適宜配合することができる。

【0013】

本発明において、不飽和脂肪酸含有油脂を製造する際使用する微生物は、モルティエレラ (*Mortierella*) 属に属する微生物であればすべて使用することができる。このような微生物としては、例えば MYCOTAXON, Vol. XLIV, No.2, pp. 257-265 (1992) に記載されている菌株を使用することができ、具体的にはモルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IF08571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IF05941、モルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) IF08568、ATCC16266、ATCC32221、ATCC42430、CBS 219.35、CBS224.37、CBS250.53、CBS343.66、CBS527.72、CBS528.72、CBS529.72、CBS 608.70、CBS754.68 等のモルティエレラ亜属 (subgenus *Mortierella*) に属する微生物や、モルティエレラ・イザベリナ (*Mortierella isabellina*) CBS194.28、IF06336、IF07824、IF07873、IF07874、IF08286、IF08308、IF07884、モルティエレラ・ナナ (*Mortierella nana*) IF08190、モルティエレラ・ラマニアナ (*Mortierella ramanniana*) IF05426、IF08186、CBS112.08、CBS212.72、IF07825、IF08184、IF08185、IF08287、モルティエレラ・ヴィナ

セア (*Mortierella vinacea*) CBS236.82 等のマイクロムコール亜属 (subgenus *Micromucor*) に属する微生物を挙げることができる。

【0014】

これらの菌株はいずれも、大阪市の財団法人醗酵研究所 (IFO)、及び米国 American Type Culture Collection (ATCC)、及びオランダ Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) からなんら制限なく入手することができる。また、本発明らが土壌から分離した菌株モルティエラ・エロンガタ SAM0219 (微工研菌寄第8703号) (微工研条寄第1239号) を使用することもできる。これらタイプカルチャーに属する菌株、あるいは自然界から分離した菌株はそのまま用いる事ができるが、増殖及び／又は単離を1回以上行なう事によって得られる元の菌株とは性質の異なる自然変異株を用いる事もできる。

【0015】

また本発明に用いる微生物は、モルティエラ属に属する微生物 (野生株) の変異株又は組み換え株、即ち同じ基質を用いて培養した時に、元の野生株が産生する量と比べて、油脂中の特定の及び／又は全部の不飽和脂肪酸含量が多くなるように、又は総油脂量が多くなるように、あるいはその両方を意図して設計されたものが含まれる。例えば、特定の不飽和脂肪酸含量が多くなるように設計された変異株として、 $\Delta 12$ 不飽和化活性の欠失したモルティエラ・アルピナ SAM1861 (微工研条寄第3590号、FERM BP-3590) や、 $\Delta 5$ 不飽和化活性の欠失したモルティエラ・アルピナ SAM1860 (微工研条寄第3589号、FERM BP-3589) を挙げる事ができる。

【0016】

さらに費用効率の優れた基質を効率良く用いて、対応する野生株と同量の不飽和脂肪酸を産生するように設計された微生物も含まれる。

上記モルティエラ属に属する微生物は、培地中のリン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンの濃度を所定の範囲に調製すること以外は、常法に従って培養することができる。例えば、上記菌株の孢子、菌糸又は予め培養して得られた前培養液を、液体培地又は固体培地に接種し培養する。炭素源としてはグルコース、フラクトース、キシロース

、サッカロース、マルトース、可溶性デンプン、糖蜜、グリセロール、マンニトール、クエン酸、コーンスターチ等の一般に使用されているものが何れも使用できるが、特にグルコース、マルトース、フラクトース、コーンスターチ、グリセロール、クエン酸が好ましい。

【0017】

窒素源としてはペプトン、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、カザミノ酸、コーンスティプリカー、尿素等の有機窒素源、並びに硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム等の無機窒素源を用いる事ができるが、特に大豆から得られる窒素源を単独または複数で、あるいは前記窒素源と組み合わせて用いることにより、より好ましい塩類添加の相乗効果が得られる。大豆から得られる窒素源としては、水分を除く成分当りの窒素含量が2%以上、好ましくは3%以上、より好ましくは5%以上である事が望ましい。

【0018】

また、大豆から得られる窒素源としては、脱脂大豆又はこれに熱処理；酸処理；アルカリ処理；酵素処理；化学修飾；又は該処理を含む化学的及び／又は物理的処理による変性及び／又は再生；水及び／又は有機溶媒を用いた一部成分の除去；濾過及び／又は遠心分離による一部成分の除去；凍結；粉碎；乾燥；及び／又は篩い分け等の加工を施したものの、あるいは未脱脂大豆に同様の加工を施したものを単独あるいは複数組み合わせて使用することができ、一般的なものとしては大豆、脱脂大豆、大豆フレーク、食用大豆タンパク、おから、豆乳、きな粉等が挙げられるが、特に、脱脂大豆に熱変性を施したものの、より好ましくは脱脂大豆を約70～90℃で熱処理しさらにエタノール可溶成分を除去したものが好ましい。

【0019】

この他に必要に応じて、リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン以外に、鉄、銅、亜鉛、マンガン、ニッケル、コバルト等の金属イオンやビタミン等を微量栄養源として使用できる。不飽和脂肪酸の収率を増加せしめるために、不飽和脂肪酸の前駆体として、例えば、ヘキサデカン若しくはオクタデカンのごとき炭化水素；オレイン酸若しくはリノ

ール酸のごとき脂肪酸又はその塩、又は脂肪酸エステル、例えばエチルエステル、グリセリン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル；又はオリーブ油、大豆油、なたね油、綿実油若しくはヤシ油のごとき油脂類を単独で、又は組み合わせて使用できる。基質の添加量は培地に対して0.001～10%、好ましくは0.5～10%である。またこれらの基質を唯一の炭素源として培養してもよい。

【0020】

本発明において培地中のリン酸イオンは5～60 mM、カリウムイオンは5～60 mM、ナトリウムイオンは2～50 mM、マグネシウムイオンは0.5～9 mM、カルシウムイオンは0.5～12 mMの範囲とし、好ましくは培地中のリン酸イオンは10～45 mM、カリウムイオンは10～45 mM、ナトリウムイオンは5～40 mM、マグネシウムイオンは1～6 mM、カルシウムイオンは1～9 mMの範囲とする。

【0021】

これらイオンの調製は、リン酸イオンは、例えば、リン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム、リン酸一水素二ナトリウム及び／又はリン酸二水素一ナトリウム等の塩類、またカリウムイオンは、例えばリン酸一水素二カリウム、リン酸二水素一カリウム及び／又は塩化カリウム等の塩類、ナトリウムイオンは、例えばリン酸一水素二ナトリウム、リン酸二水素一ナトリウム、塩化ナトリウム及び／又は硫酸ナトリウム等の塩類、マグネシウムイオンは、例えば塩化マグネシウム及び／又は硫酸マグネシウム等の塩類、カルシウムイオンは、例えば塩化カルシウム及び／又は炭酸カルシウム等の塩類を培地に添加することにより行うことができるが、これに限られるものではなく菌の生育を阻害しない物であれば特に制限しない。

【0022】

なおこれらの塩類は水和物又は無水物のいずれであってもよい。また前記の塩類は、本発明のイオン濃度の範囲内となるよう適宜、組合せて使用される。例えば、リン酸二水素一カリウム (KH_2PO_4)、無水硫酸ナトリウム (Na_2SO_4)、塩化マグネシウム六水和物 ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) 及び塩化カルシウム二水和物 ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

）の4種類を配合して所定量添加することにより、本発明のイオンを所定濃度に調製することができる。

【0023】

本発明ではこのような塩類添加により、不飽和脂肪酸収率が大幅に増大する。さらに、液体培養における菌形態への影響は、塩類以外の培地成分及び使用する菌株の影響があるため一概には特定し得ないが、例えばリン酸添加量増加に伴ってパルプ形態の菌の割合が増え、ナトリウム、カルシウム、又はマグネシウム添加量増加に伴ってペレット形態の菌の割合が増える。パルプ状での増殖は、培養液粘度を上昇させ、流動性、溶存酸素濃度低下の原因となり収率低下を引き起こす。

【0024】

一方ペレット状での増殖は粘度上昇が起こりにくく流動性は高いが、ペレット壁が酸素移動の律速となり収率低下を引き起こす。しかし、該イオンを所定濃度でかつバランス良く添加することによって過度のパルプ化、及び過度のペレット化が抑えられ、パルプとペレットの混合状態が維持されることを我々は発見した。この技術によって菌形態の制御が容易になり、非常に高い収率を得る事が可能となる。

【0025】

上記のようにして得られた不飽和脂肪酸含有脂質は、その大部分がトリグリセリドであるが、培地へのリン酸添加量増加に伴ってリン脂質の割合が増加する。しかし、リン酸以外に、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオンを全てバランス良く添加する事によって、菌体脂質中トリグリセリドの割合を90%以上に維持する事ができることを我々は発見した。目的脂質がトリグリセリドの場合、添加塩類を本発明範囲でバランスさせることによって高回収率を維持することができる。

【0026】

上記の炭素源、窒素源、その他の培地成分は培養開始前の培地及び／又は培養中の培養液に添加することができる。これらの培地成分は一度に添加することもでき、又は連続的に、若しくは複数回に分けて経時的に添加することもできる。

これらの培地成分は各々単独で、又は予め混合して殺菌、添加することができ、その殺菌方法、添加順序は特に制限しない。好ましくは、炭素源と窒素源は別々に殺菌するのが望ましく、塩類は対数増殖終了までに、より好ましくは対数増殖中期より前に添加するのが望ましい。リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カルシウムイオン濃度に影響を与えない他の培地成分は菌の生育を阻害しない濃度であれば特に制限しない。

【0027】

実用上、一般に炭素源の総添加量は0.1～30重量%、好ましくは1～15重量%、窒素源の総添加量は0.01～10重量%、好ましくは0.1～5重量%の濃度とするのが望ましく、より好ましくは初発の炭素源添加量を1～5重量%、初発の窒素源添加量を0.1～3重量%として、培養途中で炭素源及び窒素源を、さらにより好ましくは炭素源のみを流加して培養する。培養温度は5～40℃、好ましくは20～30℃とし、また20～30℃にて菌体を増殖せしめた後5～20℃にて培養を続けて不飽和脂肪酸を生産せしめることもできる。

【0028】

培地pHは4～10、好ましくは5～8として通気攪拌培養、振とう培養、又は静置培養を行う。培養は通常2～20日間行う。このように培養して、菌体内に不飽和脂肪酸を含有する脂質が生成蓄積される。不飽和脂肪酸の製造においては、液体培地による通気攪拌培養が好ましい。

目的とする脂質は、培養によって脂質を製造する途中の培養液若しくはその殺菌した培養液、または培養終了後の培養液若しくはその殺菌した培養液、またはそれぞれから集菌した培養菌体若しくはその乾燥物から、常法に従って得る事ができる。培養菌体から、例えば次の方法により目的とする脂質の採取を行う。

【0029】

培養終了後、培養液より遠心分離及び／又は濾過等の常用の固液分離手段により培養菌体を得る。培養菌体は好ましくは、水洗、破碎、乾燥する。乾燥は、凍結乾燥、風乾等によって行うことができる。乾燥菌体は、好ましくは窒素気流下で有機溶媒によって抽出処理する。有機溶媒としてはエーテル、ヘキサン、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、石油エーテル等を用いる

ことができ、またメタノールと石油エーテルの交互抽出やクロロホルム-メタノール-水の一層系の溶媒を用いた抽出によっても良好な結果を得ることができ、好ましくはヘキサンを用いて抽出する。

【0030】

抽出物から減圧下で有機溶剤を留去することにより、高濃度の不飽和脂肪酸含有脂質を得ることができる。また、上記の方法に代えて湿菌体を用いて抽出を行うことができる。この場合にはメタノール、エタノール等の水に対して相溶性の溶媒、又はこれらと水及び／又は他の溶媒とからなる水に対して相溶性の混合溶媒を使用する。その他の手順は上記と同様である。培養物から採取した不飽和脂肪酸含有脂質から不飽和脂肪酸含有トリグリセリドを分離精製するには、常法により、溶媒抽出、脱溶媒の後、脱酸、脱色、脱臭、脱ガム処理、あるいは冷却分離などにより行なう事ができる。

【0031】

【実施例】

次に、実施例によりこの発明を具体的に説明する。

実施例 1.

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68 を用いた。グルコース 2%、大豆油 0.1% 及び表 1 の組成の窒素源、塩類成分を含む培地 5 L を 4 種類、10 L 培養槽に調製し、初発 pH を 6.0 に調製した。前培養液 50 mL を接種し、温度 28℃、通気量 1.0 vvm、攪拌 300 rpm で 8 日間の通気攪拌培養を行なった。グルコース濃度を 4 日目までは流加法によって 1~2% に、それ以降は 0.5~1% に維持した。

【0032】

培養の結果、酵母エキス培地に 5 種類のイオン全てを添加するとアラキドン酸生成量が 1.35 倍に、大豆タンパクに添加すると 1.68 倍に増大し塩類添加の有効性が確認された。リン酸水素カリウムのみ添加した場合は、アラキドン酸生成量増加は認められなかった。

アラキドン酸生成量に加えて、得られた菌体よりヘキサンで脂質を抽出した後、分離条件（ヘキサン：ジエチルエーテル：ギ酸＝42：28：0.3）で TL

C法で脂質組成毎に分画し、各組成含量をTLC/FIDアナライザー（ヤトロ
ン社製イアトロスキャン）で定量した。

【0033】

その結果、リン酸水素カリウムのための添加によって、ヘキサンで抽出された菌
体脂質中のリン脂質の割合が増えること、一方、リン酸水素カリウムを含む4種
類の塩類を全て添加することによって、塩類無添加の場合と同等の脂質組成が得
られることが判り、目的生産物がトリグリセリドの場合は、全イオンをバランス
良く添加することによってトリグリセリド含量の高い脂質が得られることを確認
した。

【0034】

【表 1】

表 1

| 培 地 | 酵母 エキス1% | 大豆 タンパク 1.5% | 酵母エキス 1% | 大豆タンパク 1.5% | 大豆タンパク 1.5% |
|------------|-------------|--------------------|--|--|---|
| | | | KH ₂ PO ₄ 0.3% (22mM) | KH ₂ PO ₄ 0.3% (22mM) | KH ₂ PO ₄ 0.3% (22mM) |
| | | | MgCl ₂ ・6H ₂ O 0.05% (2.5mM) | MgCl ₂ ・6H ₂ O 0.05% (2.5mM) | |
| | | | Na ₂ SO ₄ 0.1% (7.0mM) | Na ₂ SO ₄ 0.1% (7.0mM) | |
| | | | CaCl ₂ ・2H ₂ O 0.05% (3.4mM) | CaCl ₂ ・2H ₂ O 0.05% (3.4mM) | |
| 7日培養生成量 | 2.28g/L | 1.93g/L | 3.07g/L | 3.24g/L | 2.00g/L |
| 総脂防酸生成量 | 6.57g/L | 5.74g/L | 8.82g/L | 8.95g/L | 5.83g/L |
| 乾燥菌体濃度 | 17.3g/L | 15.7g/L | 19.3g/L | 22.0g/L | 16.0g/L |
| トリグリセリド 含量 | 97.2% | 97.4% | 97.0% | 96.0% | 88.3% |
| リン脂質含量 | 1.2% | 1.2% | 1.4% | 1.2% | 9.5% |

酵母エキス：ユニバーサルフーズ社製 TASTONE154AG
大豆タンパク：味の素社製 エスサンミート特等

【0035】

実施例 2.

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68 を用いた。グルコース 2%、きな粉 1.5%、大豆油 0.1% 及び表 2 の組成の塩類成分を含む培地 25 L を 4 種類、50 L 培養槽に調製し、初発 pH を 6.2 に調製した。前培養液 50 mL を接種し、温度 28℃、通気量 1.0 vvm、攪拌 300 rpm、槽内圧 200 kPa の条件で 8 日間の通気攪拌培養を行なった。グルコース濃度を 4 日目までは流加法によって 1~2% に、それ以降は 0.5~1% に維持した。

培養の結果、塩類添加によってアラキドン酸生成量が増大し、塩類添加の有効性とより効果的な濃度範囲が確認された。

【0036】

【表 2】

表 2

| | | | | |
|---|---------|------------------|---------------|--------------|
| KH ₂ PO ₄ 添加量 | 0% | 0.075% (5.5mM) | 0.3% (22mM) | 1.2% (88mM) |
| MgCl ₂ · 6H ₂ O 添加量 | 0% | 0.0125% (0.61mM) | 0.05% (2.5mM) | 0.2% (9.8mM) |
| Na ₂ SO ₄ 添加量 | 0% | 0.025% (1.8mM) | 0.1% (7.0mM) | 0.4% (28mM) |
| CaCl ₂ · 2H ₂ O 添加量 | 0% | 0.0125% (0.85mM) | 0.05% (3.4mM) | 0.2% (14mM) |
| アラキドン酸生成量 | 2.11g/L | 2.61g/L | 2.90g/L | 1.95g/L |

【0037】

実施例 3.

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68 を用いた。グルコース 2%、脱脂大豆粉 1.5%、大豆油 0.1% 及び表 3 の組成の塩類成分を含む培地 25 L を 4 種類、50 L 培養槽に調製し、初発 pH を 6.0 に調製した。前培養液 50 mL を接種し、温度 28℃、通気量 1.0 vvm、攪拌 300 rpm、槽内圧 200 kPa の条件で 8 日間の通気攪拌培養を行なった。グルコース濃度を 4 日目までは流加法によって 1~2% に、それ以降

は0.5～1%に維持した。

【0038】

塩類無添加培地では、菌形態がペレットとパルプの混合状態で増殖し、ペレットの大部分は米粒型で約0.5～1.5mmであった。リン酸塩のみを加えた培地では、非常に細かいパルプ状に増殖し、培地流動性が大きく低下した。一方、マグネシウム、カルシウム、ナトリウム塩を加えた培地では菌の殆どが球状で約1～2mm径のペレットとなり、流動性は高いが菌体当たりの脂質含量が低い結果となった。しかし、4種類の塩の全てを添加した培地では、細かい球状ペレットとパルプの混合培養となり、流動性が損なわれることなく、脂質含量が高い菌体得られ、その結果、アラキドン酸収率向上が達成された。

【0039】

【表3】

表3

| | | | | |
|---|---------|---------------|------------|---------------|
| KH ₂ PO ₄ 添加量 | 0% | 0% | 0.3%(22mM) | 0.3%(22mM) |
| MgCl ₂ ・6H ₂ O添加量 | 0% | 0.025%(1.2mM) | 0% | 0.025%(1.2mM) |
| Na ₂ SO ₄ 添加量 | 0% | 0.05%(3.5mM) | 0% | 0.05%(3.5mM) |
| CaCl ₂ ・2H ₂ O添加量 | 0% | 0.025%(1.7mM) | 0% | 0.025%(1.7mM) |
| アラキドン酸生成量 | 2.30g/L | 2.20g/L | 2.33g/L | 3.10g/L |

【0040】

実施例4.

アラキドン酸生産菌としてモルティエレラ・エロンガタ (*Mortierella elongata*) IF08570、モルティエレラ・エキシグア (*Mortierella exigua*) IF08571、モルティエレラ・ヒグロフィラ (*Mortierella hygrophila*) IF05941を用いた。グルコース2%、食用大豆タンパク(味の素社製、エスサンプロテインS)1.5%、なたね油0.1%及び表5の組成成分を添加した6種類(2種類×3菌株)の培地25Lを各々50L培養槽に調製し、初発pHを5.8に調製

した。温度24℃、通気量1.0vvm、攪拌200rpm、槽内圧1.0kg/cm²Gの条件で通気攪拌培養を開始し、7日間培養を行った。流加法によりグルコース濃度を5日目までは1.5%に維持し、その後はグルコースを流加しなかった。培養7日目の終了時にはグルコースが枯渇した。

その結果、塩類添加によるアラキドン酸収率増大が確認された。

【0041】

【表4】

表4

| | | |
|---|---------|---------------|
| KH ₂ PO ₄ 添加量 | 0 % | 0.3% (22mM) |
| MgCl ₂ ・6H ₂ O添加量 | 0 % | 0.05% (2.5mM) |
| Na ₂ SO ₄ 添加量 | 0 % | 0.1% (7.0mM) |
| CaCl ₂ ・2H ₂ O添加量 | 0 % | 0.05% (3.4mM) |
| モルティエラ・エロンガタ IFO 8570 アラキドン酸生成量 | 1.50g/L | 2.20g/L |
| モルティエラ・エキシグア IF08571 アラキドン酸生成量 | 1.20g/L | 1.45g/L |
| モルティエラ・ヒグロフィラ IF05941 アラキドン酸生成量 | 1.25g/L | 1.45g/L |

【0042】

実施例5.

アラキドン酸生産菌としてモルティエラ・アルピナ (*Mortierella alpina*) CBS754.68 を用いた。初発グルコース2%、大豆油0.1%及び培養途中流加も含む表6の組成の窒素源及び塩類成分の培地25Lを6種類、50L培養槽に調製し、初発pHを6.0に調製した。前培養液100mLを接種し、温度24℃、通気量1.0vvm、攪拌200rpm、槽内圧200kPaで8日間の通気攪拌培養を行なった。

【0043】

グルコース濃度を4日目までは流加法によって1~2%に、それ以降は0.5~1%に維持した。窒素源を流加した場合は溶存酸素濃度を維持するために、表5の条件3及び4は攪拌を300rpmまで、条件5及び6は400rpmまで上昇させた。

培養の結果、塩類添加によるアラキドン酸生成量が確認された。さらに、栄養源を多量添加して比較的高い濃度で培養を行った場合でも、塩類添加効果が確認された。

【0044】

【表 5】

| 条件番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|--|---------|---------------|---------|---------------|---------|---------------|
| 初発大豆タンパク量 | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% | 1.5% |
| 大豆タンパク途中流加量 | | | 0.6% | 0.6% | 1.6% | 1.6% |
| 初発 KH_2PO_4 量 | | 0.3% (22mM) | | 0.3% (22mM) | | 0.3% (22mM) |
| 初発 $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 量 | | 0.05% (2.5mM) | | 0.05% (2.5mM) | | 0.05% (2.5mM) |
| 初発 Na_2SO_4 量 | | 0.1% (7.0mM) | | 0.1% (7.0mM) | | 0.1% (7.0mM) |
| 初発 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 量 | | 0.05% (3.4mM) | | 0.05% (3.4mM) | | 0.05% (3.4mM) |
| アラキドン酸生成量 | 3.60g/L | 4.90g/L | 5.00g/L | 6.81g/L | 7.32g/L | 9.04g/L |

大豆タンパク：味の素社製 エスサンミート特等

【0045】

実施例 6.

ミード酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナSAM1861（微工研条寄第3590号、FERM BP-3590）を、ジホモγーリノレン酸生産菌としてモルティエレラ・アルピナSAM1860（微工研条寄第3589号、FERM BP-3589）を用いた。初発グルコース2%、大豆タンパク（味の素社製、エスサンミート特等）1.5%、オリーブ油0.1%及び表6の組成の塩類成分を含む培地5Lを4種類（2種類×2菌株）、10L培養槽に調製し、初発pHを6.0に調製した。前培養液100mlを接種し、温度28℃、通気量1.0vvm、攪拌300rpmで8日間の通気攪拌培養を行った。培養温度は2日目に20℃に下げた。また、グルコース濃度を流加法によって1～2%に維持した。

その結果、塩類添加によるミード酸及びジホモγーリノレン酸収率増大が確認された。

【0046】

【表6】

表 6

| | | |
|---|---------|---------------|
| KH ₂ PO ₄ 添加量 | 0 % | 0.3% (22mM) |
| MgCl ₂ ・6H ₂ O添加量 | 0 % | 0.05% (2.5mM) |
| Na ₂ SO ₄ 添加量 | 0 % | 0.1% (7.0mM) |
| CaCl ₂ ・2H ₂ O添加量 | 0 % | 0.05% (3.4mM) |
| モルティエレラ・アルピナ SAM1861 ミード酸生成量 | 1.52g/L | 1.92g/L |
| モルティエレラ・アルピナ SAM1860 ジホモγーリノレン酸生成量 | 2.06g/L | 2.31g/L |

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 新規な微生物培養用培地、並びに不飽和脂肪酸の微生物的製造方法における生産性向上方法の提供。

【解決手段】 リン酸イオン、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン及びカルシウムイオンが、それぞれ5～60 mM、5～60 mM、2～50 mM、0.5～9 mM、0.5～12 mMの範囲にあることを特徴とする微生物培養用培地、並びに不飽和脂肪酸またはこれを含む脂質の製造方法であって、モルティエレラ (Mortierella) 属に属する微生物を、リン酸イオンが5～60 mM、カリウムイオンが5～60 mM、ナトリウムイオンが2～50 mM、マグネシウムイオンが0.5～9 mMおよびカルシウムイオンが0.5～12 mMの範囲にある培地中で、培養することを特徴とする不飽和脂肪酸またはこれを含む脂質の製造方法。

【選択図】 なし

【書類名】 職権訂正データ
【訂正書類】 特許願

<認定情報・付加情報>

【特許出願人】

【識別番号】 000001904
【住所又は居所】 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号
【氏名又は名称】 サントリー株式会社

【代理人】

申請人
【識別番号】 100077517
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 石田 敬

【選任した代理人】

【識別番号】 100087871
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 福本 積

【選任した代理人】

【識別番号】 100088269
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 戸田 利雄

【選任した代理人】

【識別番号】 100082898
【住所又は居所】 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所
【氏名又は名称】 西山 雅也

特平 8-349541

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000001904]

| | |
|----------|---------------------|
| 1. 変更年月日 | 1990年 8月13日 |
| [変更理由] | 新規登録 |
| 住 所 | 大阪府大阪市北区堂島浜2丁目1番40号 |
| 氏 名 | サントリー株式会社 |

THIS PAGE BLANK (USPTO)